

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**“EVALUACIÓN DE MÉTODOS PARA RECUPERACIÓN DE FORMAS
INMADURAS DE NEMATODES DE IMPORTANCIA ZONÓTICA EN ARENA DE
PLAYA DE MONTEVIDEO”**

Por

Ana Laura PÉREZ SARASQUETA
Mara RAÑA LÓPEZ

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2016

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de Mesa:

Dra. Zully Hernández

Segundo Miembro (tutor):

Dra. Eleonor Castro Janer

Tercer Miembro:

Dr. José Manuel Venzal

Cuarto Miembro:

Dra. Laura Chifflet

Fecha:

01/12/2016

Autores:

Br. Ana Pérez Sarasqueta

Br. Mara Raña López

AGRADECIMIENTOS

A A nuestra compañera Br. Nadia González.

A nuestra tutora Dra. Eleonor Castro y co-tutora Dra. Laura Chifflet por confiar en nosotras para este trabajo, por ayudar en nuestra formación profesional y dedicarnos su tiempo.

A todos los integrantes del Departamento de Parasitología Veterinaria por su colaboración.

Al personal de Biblioteca por la ayuda en la búsqueda de material bibliográfico.

Al Q.F. Sergio Gigena del área de Farmacia del Centro Hospital Veterinario.

Al Biólogo Ernesto Brugnoli del área de Oceanografía y Ecología Marina de Facultad de Ciencias, y a los integrantes de la Unidad de Análisis de Agua de Facultad de Química.

Al Departamento de Bioestadística e Inmunología de la Facultad de Veterinaria por su colaboración en el préstamo de equipos durante la actividad práctica y a sus docentes por siempre responder a las consultas planteadas.

A nuestras familias, pareja, amigos y compañeros por toda la ayuda y aguante durante toda la carrera y permitir que este logro sea posible.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS	6
RESUMEN	7
SUMMARY	8
1. INTRODUCCIÓN	9
1.1. Antecedentes en Uruguay.....	10
1.2. Técnicas para la recuperación de huevos y larvas.....	11
2. HIPÓTESIS	14
3. OBJETIVOS	14
3.1. Objetivo general.....	14
3.2. Objetivos específicos.....	14
4. MATERIALES Y MÉTODOS	15
4.1. Obtención de Huevos de <i>Toxocara</i> spp. y L ₃ de <i>Ancylostoma</i> spp.....	15
4.2. Preparación de suspensiones de huevos y larvas.....	15
4.3. Muestras de Arena.....	16
4.4. Preparación y contaminación de muestras de arena.....	16
4.5. Preparación de soluciones de flotación.....	17
4.6. Técnicas.....	17
4.6.1. Técnica de Willis.....	17
4.6.1.1. Controles durante la técnica de Willis.....	18
4.6.2. Técnica de Sedimentación-flotación.....	18
4.6.2.1. Descripción de la técnica (protocolo de Dunsmore y col. Modifica).....	19
4.6.2.2. Controles de la técnica.....	20
4.6.3. Técnica de Baermann modificada.....	20
4.6.3.1. Descripción de la técnica (protocolo de la técnica).....	20
4.7. Estimación de costos.....	21
4.8. Análisis estadístico.....	21
4.8.1. Ensayo de repetibilidad de los operadores.....	21

5. RESULTADOS	22
6. DISCUSIÓN	32
7. CONCLUSIONES	34
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE TABLAS Y FIGURAS

	Página
Tabla 1. Modificaciones aplicadas a la técnica descrita por Dunsmore y col. (1984).....	19
Tabla 2. Huevos recuperados de <i>Toxocara</i> spp. a partir de muestras de arena con distintos grados de contaminación, mediante la técnica de Willis con diferentes soluciones.....	23
Tabla 3. Huevos recuperados de <i>Toxocara</i> spp. a partir de muestras de arena con distintos grados de contaminación, mediante la técnica de sedimentación-flotación con diferentes soluciones.....	26
Tabla 4. Efecto de la adición de Tween® 20 a las soluciones de flotación en el método de Willis para la recuperación de huevos de <i>Toxocara</i> spp.....	27
Tabla 5. Efecto de la adición de Tween® 20 a las soluciones de flotación en el método de sedimentación-flotación para la recuperación de huevos de <i>Toxocara</i> spp.....	27
Tabla 6. Larvas de tercer estadio recuperadas de muestras de arena con distintos grados de contaminación, mediante la técnica de Willis con diferentes soluciones..	29
Tabla 7. Recuperación de larvas de tercer estadio de muestras de arena con distintos grados de contaminación, mediante la técnica de Baermann modifica.....	29
Tabla 8. Frecuencia de muestras con presencia de huevos, de acuerdo al grado de contaminación y al método de recuperación utilizado.....	30
Tabla 9. Frecuencia de muestras con presencia de larvas, de acuerdo al grado de contaminación y al método de recuperación utilizado.....	30
Tabla 10 Comparación de la preparación de soluciones de flotación, su costo por litro de solución (con y sin el agregado de Tween® 20) y por muestra, según el método de Willis y el método de Sedimentación-flotación.....	31
Figura 1. Porcentaje de recuperación de huevos mediante el método de Willis con diferentes soluciones de flotación de acuerdo al grado de contaminación (GC) en 50 g de arena.....	24
Figura 2. Porcentaje de recuperación de huevos mediante el método de sedimentación- flotación con diferentes soluciones de flotación de acuerdo al grado de contaminación (GC) en 50 g de arena.....	25
Figura 3. Porcentaje de recuperación de larvas mediante el método de Willis con diferentes soluciones de flotación y el método de Baermann modificado, de acuerdo al grado de contaminación (GC) en 50 g de arena.....	28

RESUMEN

Las heces de caninos y felinos constituyen una fuente importante de contaminación de los suelos con formas inmaduras de parásitos con potencial zoonótico. El monitoreo de los suelos en lugares de recreación es fundamental para determinar el riesgo que representan para el hombre. La estructura de los diferentes suelos puede interferir en la recuperación de las formas preparasíticas, por lo que se requiere estandarizar una técnica para cada tipo de suelo. Contar con técnicas sensibles y fáciles de ejecutar contribuiría con las medidas de control, facilitando el diagnóstico. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la recuperación de huevos de *Toxocara canis* y larvas de *Ancylostoma caninum* usando como sustrato arena de playa, mediante diversas técnicas de enriquecimiento (métodos de Willis, sedimentación-flotación y Baermann), con la finalidad de contar con un método sensible y simple para estudios epidemiológicos futuros. Las muestras de arena fueron obtenidas de Playa Verde, por tener el tamaño de grano más común que se observa en las playas de Montevideo. La arena fue esterilizada y fraccionada para posteriormente ser contaminada. Se establecieron tres grados de contaminación (GC), bajo, medio y alto: 10, 50 y 100 huevos o larvas cada 50 g de arena respectivamente. Los huevos de *T. canis* fueron obtenidos por disección de hembras y las larvas de *A. caninum*, a partir del cultivo de heces de perros. Primero se evaluó el método de Willis para la recuperación de huevos de *T. canis*, con las siguientes soluciones: NaCl, NaNO₃, ZnSO₄, MgSO₄, azúcar+NaCl, con y sin el agregado de Tween® 20. Posteriormente se evaluó el método de sedimentación-flotación utilizando las tres soluciones que fueron más eficientes en la recuperación por el método de Willis (NaNO₃, MgSO₄, azúcar+NaCl, con y sin Tween® 20). También se evaluó el método de Willis con estas soluciones y el método de Baermann para la recuperación de larvas. En cada método, y para cada uno de los GC, las soluciones se evaluaron tres veces realizando tres repeticiones. Los datos fueron analizados mediante un modelo de regresión lineal múltiple. El método de Willis recuperó significativamente más huevos que la técnica de sedimentación-flotación, usada rutinariamente para la determinación de elementos preparasíticos en los estudios de suelo. Fue más eficiente en su recuperación tanto cuando el GC de la arena fue bajo (0,2 huevos/g) como alto (2 huevos/g). El efecto de la adición de Tween® 20 a las soluciones tuvo resultados variables según la solución utilizada, mostrando una interacción negativa (MgSO₄, azúcar+NaCl), positiva (NaCl, NaNO₃), o neutra (ZnSO₄). Con el método de Willis también se recuperaron larvas en todas las soluciones evaluadas, pero con porcentajes inferiores a los obtenidos por el método de Baermann. La sensibilidad del método de Willis para GC bajos y medios (0,2 larvas/g y 1 larva/g) fue menor. El método de Willis fue el más sensible, simple y económico para la recuperación de huevos de *T. canis* empleando NaNO₃+Tween® 20, por lo que se recomienda su utilización para estudios epidemiológicos en playas. Si bien esta técnica permite la recuperación de larvas de *A. caninum*, su sensibilidad es menor que la técnica de Baermann, recomendándose esta última para la detección de larvas en arena.

SUMMARY

Cat and dog feces are an important source of soil contamination with immature forms of parasites with zoonotic potential. Monitoring soils in recreation areas is essential to determine the risk of infection for humans. The structure of soils could interfere in the recovery of preparasitological forms. Therefore, standardization of a technique for every kind of soil is required. Having sensitive and simple techniques would contribute with control measures, making diagnosis easier. The aim of this work was to evaluate the recovery of *Toxocara canis* eggs and *Ancylostoma caninum* larvae using beach sand as substrate by means of different enrichment techniques (Willis method, sedimentation-flotation and Baermann method) in order to have a sensitive and simple method for future epidemiological studies. The samples of sand were obtained from Playa Verde, Montevideo because it presents a medium sized grain of sand. The sand was sterilized and fractioned to be experimentally contaminated later on. Three degrees of contamination (DC) were established: low, medium and high: 10, 50 and 100 eggs or larvae for each 50g of sand respectively. The *T. canis* eggs were obtained by dissection of females and the *A. caninum* larvae were obtained by culture of dog feces. Firstly, the Willis method was evaluated with the following solutions: NaCl, NaNO₃, ZnSO₄, MgSO₄, sugar+NaCl, with and without the addition of Tween® 20. After that, the sedimentation-flotation method was evaluated by using the three most efficient solutions in the recovery by the Willis method (NaNO₃, MgSO₄, sugar+NaCl, with and without Tween® 20). Also, the Willis method was evaluated by these solutions and the Baermann method for the recovery of larvae. The solutions were evaluated three times by doing three repetitions for each method and for each DC. Data was analyzed by a method of multiple linear regression. More eggs were recovered with the Willis method than with the sedimentation-flotation technique, which is usually used to determine preparasitological elements in studies of soil. It was more efficient in the recovery when the sand DC was low (0,2 egg/g) as well as high (2 eggs/g). The effect of adding Tween® 20 to the solutions had variable results according to the solution used, showing a negative interaction (MgSO₄, sugar+NaCl), positive interaction (NaCl, NaNO₃) or neutral interaction (ZnSO₄). Larvae were also recovered with the Willis method in all the solutions evaluated, but the percentages were lower than those obtained with the Baermann method. The sensitivity of the Willis method for low and medium DC (0,2 larva/g and 1 larva/g) was lower. The Willis method was the most sensitive, simplest and economic method for recovering *T. canis* eggs using NaNO₃+Tween® 20, so its use is recommended in epidemiological studies at beaches. Although this technique allows the recovery of *A. caninum* larvae, its sensitivity is lower than that of the Baermann technique. Therefore, we suggest using the latter in order to detect larvae in sand.

1 INTRODUCCIÓN

En los últimos años las enfermedades zoonóticas han cobrado mayor relevancia en la salud pública, debido a que la mayoría de los brotes de enfermedades infecciosas en el hombre se debieron a agentes zoonóticos (Instituto Colombiano Agropecuario y Organización Panamericana de la Salud, 2002; Institute of Medicine, 2002). En el marco de estas enfermedades, no debe subestimarse el rol esencial que tienen las mascotas en la transmisión de las mismas (Ambroise-Thomas, 2000; Acha y Szyfres, 2003).

Una de las infecciones zoonóticas por helmintos más frecuentes del mundo es el síndrome de larva migrans visceral (LMV) y ocular (LMO), producida por la ingesta de huevos larvados (larva de segundo estadio-L₂) de *Toxocara canis*, principalmente, y de *T. cati* (Magnaval y col., 2001), debido al tipo de ciclo biológico, distribución y sobrevida de estos parásitos en el ambiente.

Una hembra adulta de *Toxocara* spp. puede producir 200.000 huevos por día (Douglas y Baker, 1966). Estos huevos son sub esféricos, de 75-90 μ , presentando leves diferencias de tamaño y gravedad específica (GE) entre *T. canis* y *T. cati*, siendo esta última de 1,09 y 1,10 respectivamente (David y Lindquist, 1982). Poseen una capa externa gruesa y rugosa, compuesta de glicoproteínas (Despommier, 2003) que les permite sobrevivir en el ambiente a condiciones adversas de temperatura (a -20 °C en materia fecal y 0,2 °C debajo de la nieve (Parsons, 1987)), de humedad (a 3 % de humedad (Gamboa, 2005)) y en diferentes tipos de suelos (Nunes y col., 1994), por lo que pueden permanecer viables e infectantes para hospederos susceptibles por largos períodos de tiempo (Gamboa y col., 2009).

El ciclo biológico es directo con migraciones. Las formas adultas de *T. canis* y *T. cati* parasitan el intestino delgado de cánidos y félidos, respectivamente. Los huevos no embrionados son eliminados al exterior con la materia fecal, donde se desarrollarán en su interior diferentes estadios larvarios. La forma infectante es el huevo embrionado con la larva de segundo estadio (L₂) en su interior. Esto ocurre en el suelo entre 10-15 días en condiciones ambientales óptimas de humedad (85-90 %) y temperatura (25-30 °C) (Parsons, 1987). Las vías de infección son oral y transplacentaria, siendo esta última la principal en caninos. Los hospederos paraténicos pueden jugar un rol importante en la cadena epidemiológica (roedores, conejos, lombrices de tierra, pollos, palomas, corderos y cerdos) (Glickman y Schantz, 1981). Una vez que las larvas llegan al intestino delgado, realizan una migración entero-hepato-pulmonar para completar su desarrollo. En hospederos mayores a 6 meses de edad algunas larvas no pasan por el pulmón, sino que desde el corazón se distribuyen a los tejidos quedando acantonadas (migración somática), responsables de mantener la parasitosis. En hembras preñadas, a partir del día 40 de gestación, se reactivarán y alcanzarán la placenta. Los principales síntomas en estos hospederos son la diarrea y el retardo en el crecimiento.

La zoonosis asociada a este género parasitario se caracteriza por presentar diferentes manifestaciones clínicas como resultado de la migración larvaria (larva de tercer estadio-L₃) por los diferentes tejidos. Comprende 4 síndromes, dos con sintomatología bien definida como LMV y LMO, mencionados previamente, y otros dos síndromes con sintomatología inespecífica en adultos (Glickman y col., 1987) y en niños (Taylor y col., 1988), descritos luego de buscar una explicación entre los

pocos casos de LMV y LMO, y las altas tasas de seroprevalencia. El síndrome de LMV es más frecuente en niños menores de 5 años, con antecedentes de geofagia, contacto regular con areneros, parques y jardines contaminados con huevos larvados de *Toxocara* spp.. La migración larvaria por hígado, pulmón, cerebro y ojos provoca lesiones hemorrágicas, necrosis e inflamación con marcada eosinofilia (Dent y col., 1956). El síndrome de LMO ocasiona en casos severos la pérdida de la visión por lesiones granulomatosas de la retina (Gillespie y col., 1993).

Otra geohelmintiasis importante como zoonosis es el síndrome de larva migrans cutánea (LMC), ocasionada por larvas infectantes (L₃) principalmente de *Ancylostoma braziliense* y, eventualmente, *Ancylostoma caninum* y *Uncinaria stenocephala*, nematodos de carnívoros. Es de distribución mundial y endémica en países tropicales y subtropicales en vías de desarrollo. Los climas cálidos y húmedos son los más favorables y las áreas de mayor riesgo son las que presentan suelos arenosos y húmedos, como playas y parques, lo que aumenta el riesgo de infección para el hombre (Plascencia-Gómez y col, 2013).

Una hembra adulta de *Ancylostoma* spp. produce en promedio 16.000 huevos diarios. Los mismos miden aproximadamente entre 56-75 µm por 34-57 µm, con GE de 1,06. Poseen una cáscara fina y contienen entre 8-16 células cuando son eliminados en las heces del hospedero. En una semana aproximadamente, con humedad relativa superior a 70 % y temperaturas entre 23-30 °C *A. caninum* desarrolla el estadio infectante L₃. Sin embargo, *A. braziliense* requiere de temperaturas más alta para desarrollar y completar su ciclo (Soulsby, 1987).

Los ejemplares adultos viven en el intestino delgado de caninos, felinos y otros carnívoros, pudiendo ocasionar sintomatología aguda importante al producir anemia, hasta cuadros crónicos y subclínicos. Las formas de infección para los carnívoros pueden ser: oral, percutánea y lactogénica. La L₃ atraviesa la piel intacta de zonas donde la misma es delgada, húmeda y con poco pelo (espacios interdigitales, axilas, ingle y vientre) atraídas por la alta concentración de dióxido de carbono en la piel (Miller y col., 1991). Puede darse una migración traqueal o, en otros casos, una migración somática de las larvas hacia los músculos, para luego permanecer en hipobiosis. Estas larvas quiescentes son las responsables de mantener la población parasitaria, constituyendo la principal fuente de infección en cachorros.

En el hombre las larvas infectantes penetran la epidermis, migran por el subcutáneo produciendo reacciones inflamatorias, ocasionando intenso prurito. Se ha demostrado que esa invasión a los tejidos es producto de la acción de proteasas y hialuronidasas que sintetizan las larvas de estos nematelmintos (Hotez y col., 1992). Las lesiones características son pápulas, trayectos sinuosos, eritematosos y en ocasiones vesiculosos. Las regiones anatómicas más afectadas son los pies, glúteos y muslos. El caminar descalzo es el tipo más común de exposición, siendo un riesgo potencial en niños, turistas, trabajadores rurales y del sector minero.

1.1 Antecedentes en Uruguay

En nuestro país, se han realizado numerosos trabajos sobre zoonosis mayores como la hidatidosis. Sin embargo, otras importantes zoonosis como el síndrome de larva migrans han sido poco estudiadas, principalmente desde el punto de vista epidemiológico.

Pérez y col. (1991) estudiaron la contaminación de plazas y parques públicos por helmintos de importancia zoonótica en Montevideo, mediante el análisis de muestras de suelo por técnicas de flotación. Del total de 204 muestras analizadas, 28,9 % resultaron positivas a diferentes géneros parasitarios. *T. canis* fue la especie más prevalente (58,1 %) seguida de *A. caninum* (48,4 %).

Otro estudio realizado en plazas de Montevideo, comprendió la recolección de muestras de diversos tipos de suelos y heces, para determinar la contaminación con huevos de *Toxocara* spp. y su relación con las condiciones higiénico-sanitarias de los habitantes (Hernández y col., 2003). Las muestras fueron procesadas por la técnica de flotación siguiendo el protocolo de Quinn y col. (1980). Los resultados también indicaron una alta prevalencia (52,9 %) de huevos de *Toxocara* spp. en lugares de recreación. Los tipos de suelos más contaminados fueron los de tierra, seguidos por los de mezcla de arena-tierra. La prevalencia de *Toxocara* spp. fue mayor en suelos y materias fecales de áreas cuya población presentaba mayor número de necesidades básicas insatisfechas.

Cabrera y col. (1987) realizaron un estudio de parásitos de importancia zoonótica en 60 perros en Montevideo y determinaron, mediante necropsia parasitaria, una prevalencia de 38 % de *A. caninum*, no encontrándose *A. braziliense*, muy común en la región norte del país. Posteriormente, Malgor y col. (1996) realizaron un estudio sobre prevalencia de *Ancylostoma* spp. en perros asociado con un foco endémico de LMC en la ciudad de Tacuarembó, Uruguay (Ferreira y Ferreira, 1991). Mediante necropsia parasitaria de 80 perros vagabundos, se demostró una alta prevalencia *A. caninum* (96,3 %) donde 49,4 % de estos perros presentaba también *A. braziliense*. Asimismo, fue alta la prevalencia de *Ancylostoma* spp. (53,7 %) encontrada por Valledor y col. (2006) en un estudio realizado en 95 perros de áreas urbanas y rurales de los departamentos de Montevideo y Florida.

Un relevamiento de helmintos realizado en 22 gatos domésticos, mediante necropsia parasitaria (Castro y col., 2013), mostró que *T. cati* era el parásito más prevalente, habiéndose encontrado en 8 gatos mientras que *Ancylostoma* spp. fue hallado únicamente en 3 gatos.

1.2 Técnicas para la recuperación de huevos y larvas

Para la realización de estudios epidemiológicos, se han empleado diversas técnicas coproparasitológicas para la recuperación de formas parasitarias, tales como huevos, ooquistes y larvas. Las técnicas de enriquecimiento por flotación y por sedimentación, permiten concentrar los elementos parasitarios de interés, usando un principio físico-químico basado en la GE del elemento que se está buscando. La elección de la misma dependerá, principalmente, del sustrato del cual se parta (heces, arena, tierra, etc.) y de la sensibilidad de la técnica.

Las técnicas de flotación se basan en la propiedad que tienen las soluciones de mayor GE para hacer flotar elementos con menor GE (ej. ooquistes de protozoos, huevos de helmintos), donde la mayoría de los detritos sedimentarán en la solución, y de esta forma se podrán recuperar los elementos de interés en la superficie. La técnica de flotación simple más utilizada es la descrita por Willis (Laboratorio Central Veterinario, 1973). Diversas soluciones de flotación con propiedades fisico-químicas diferentes son utilizadas, siendo la más frecuente el cloruro de sodio (NaCl), GE=1,20.

El principio inverso sucede en las técnicas de sedimentación, en las que sedimentan todas aquellas partículas que tengan mayor GE que la solución empleada (agua con un $GE = 1$), permitiendo concentrar los elementos de interés en el sedimento, lo que conlleva a la obtención de preparados con mayor cantidad de residuos, que los obtenidos por flotación.

La eficacia de los métodos de flotación en muestras de suelos, está influenciada por el tamaño de la misma, la textura, el grado de contaminación de los suelos, el tratamiento realizado previamente a la muestra, la solución de flotación y el tiempo de flotación empleados (Nunes y col., 1994). Las soluciones de flotación más estudiadas han sido: cloruro de sodio ($NaCl$), nitrato de sodio ($NaNO_3$), sulfato de zinc ($ZnSO_4$), sulfato de magnesio ($MgSO_4$). Las mismas se han empleado en métodos de flotación modificados como la centrifugación-flotación, no habiéndose testado aún para métodos de flotación simple.

Con la finalidad de desarrollar técnicas de diagnóstico más sensibles, se han realizado varios estudios evaluando el método de sedimentación-flotación para la recuperación de huevos de ascáridos en suelos (Dada, 1979; Quinn y col., 1980; Kazacos, 1983; Dunsmore y col., 1984).

Quinn y col. (1980) estudiaron la recuperación de huevos de *Toxocara* spp. mediante una técnica de centrifugación-flotación, usando siete soluciones de flotación y muestras de suelo contaminadas artificialmente. Estos autores concluyeron que la solución saturada de $MgSO_4$ ($GE: 1,275$) fue la que tuvo un porcentaje de recuperación significativamente mayor (82,5 %) que las otras. Asimismo, realizaron cuatro flotaciones consecutivas concluyendo que la mayoría de los huevos (69-75 %) se recuperaban en la primera flotación.

Por otro lado, Kazacos (1983) comparó un método de flotación con dos soluciones, azúcar y $NaNO_3$, y otro método de centrifugación-flotación con varias soluciones, entre ellas $NaNO_3$, para la recuperación de huevos de suelo contaminado. El método de centrifugación-flotación resultó más eficaz, tal vez debido a la realización de un pretratamiento de las muestras con un detergente no iónico, el lavado del sedimento y la utilización de $NaNO_3$ como solución de flotación ($GE=1,35$).

Dunsmore y col. (1984) realizaron un estudio de prevalencia de huevos de *Toxocara* spp. en suelos, utilizando la técnica de Quinn y col. (1980) modificada. Previamente testaron la técnica en muestras de 25 g de suelo contaminadas artificialmente con un total de 100-110 huevos, con la finalidad de determinar el nivel de detectabilidad de la técnica. Obtuvieron una recuperación de 75-90 % usando $NaNO_3$ ($GE=1,22$) lo que permitió que sea una solución de flotación adecuada para la recuperación de huevos en suelo.

En los métodos citados anteriormente (Quinn y col., 1980; Kazacos, 1983; Dunsmore y col., 1984) se emplea un detergente no iónico (Tween®) con el fin de promover la recuperación de huevos. El Tween® reduce la tensión superficial de los líquidos permitiendo una mejor disgregación de las partículas (Salager, 2002), lo que facilitaría la detección de huevos en el sustrato.

Muy pocos trabajos se han realizado para recuperar huevos/larvas en muestras de arena. Oge y Oge (2000) compararon los métodos de recuperación de huevos de *T. canis* previamente descritos para diferentes suelos, en muestras de arena. Trabajaron con muestras de 50 g de arena contaminadas artificialmente con 10, 100 y 500 huevos. El mayor porcentaje de recuperación lo obtuvieron con la técnica

decrita por Dunsmore y col. (1984) utilizando NaNO_3 (GE=1,22). Los porcentajes de recuperación para las muestras contaminadas con 10, 100 y 500 huevos fueron 10 %, 15 % y 14,6 %, respectivamente. En términos generales, los resultados fueron notoriamente más bajos que los obtenidos por los autores mencionados anteriormente, demostrando que la variabilidad de los resultados se debe fundamentalmente al sustrato y no tanto a la metodología.

Santarém y col. (2009) usando una técnica de centrifugación-flotación, compararon la recuperación de huevos de *Toxocara* spp. con cinco soluciones de flotación con GE=1,20. Los mejores resultados se obtuvieron con ZnSO_4 y NaNO_3 , sin embargo al aumentar la GE de estas soluciones no se aumentó el porcentaje de recuperación de huevos.

Para estudios de prevalencia de huevos *Toxocara* spp. en el ambiente se utilizaron las técnicas inicialmente citadas con algunas modificaciones (Nunes y col., 1994; Nunes y col., 2000; Hernández y col., 2003; Gamboa 2005; Guimarães y col., 2005; Alonso y col., 2006; Gamboa y col., 2009; Rosa Xavier y col., 2010).

La importancia de la presencia de huevos y larvas de *Ancylostoma* spp. en suelos como fuente de infección de LMC, ha sido también objeto de estudio por varios autores (Cabrera y col., 1987; Pérez y col., 1991; Malgor y col., 1996; Nunes y col., 2000; Scaini y col., 2003; Santarém y col., 2004; Guimarães y col., 2005; Santos y col., 2006; Alves Lima y col., 2007). En dichos trabajos los huevos de *Ancylostoma* spp. fueron recuperados por varios protocolos de centrifugación-flotación y las larvas mediante la técnica de Baermann modificada (Carli, 2001). Sin embargo, no se han realizado estudios para evaluar su uso y eficiencia en muestras de suelo, a diferencia de lo que ha ocurrido con los métodos para la recuperación de huevos de *Toxocara* spp..

La mayoría de los estudios que notifican la contaminación de *Ancylostoma* spp. y *Toxocara* spp. se han realizado en jardines, parques y plazas públicas, y pocos se han enfocado en la contaminación de las playas (Milano y Oscherov, 2002; Scaini y col., 2003; Sousa González y Cáceres y col., 2004; Santos y col., 2006). En los suelos arenosos es donde se registra la mayor recuperación de huevos de *T. canis* (Nunes y col., 1994).

Estudios realizados en Brasil, en areneros, demostraron una prevalencia alta de larvas de *Ancylostoma* spp. de 35,7 % en verano y 46,4 % en invierno, mientras que para huevos de *Ancylostoma* spp. fue significativamente menor (0,56 %) (Nunes y col., 2000). Por otro lado, estudios realizados en playas de Salvador-Bahía, mostraron que todas las playas estudiadas estaban contaminadas por uno o más helmintos. Del total de muestras positivas 78,7 % correspondieron a *Ancylostoma* spp. y 19,4 % a *Toxocara* spp. (Santos y col., 2006).

En 2009, Uruguay tenía 1.130.000 perros, 490.000 en Montevideo y 640.000 en el interior (Uruguay..., 2009), siendo un país de 3.286.314 habitantes (INE, 2011). Teniendo en cuenta que nuestras playas son muy frecuentadas por perros durante todo el año y que estos son portadores de agentes zoonóticos, habría un riesgo muy importante para la salud pública, el que podría ser monitoreado si se dispusieran de técnicas adecuadas con alta sensibilidad. Las técnicas de sedimentación-flotación aplicadas en distintos suelos, ya descritas, han mostrado una variabilidad importante en los resultados obtenidos, por lo que sería de utilidad evaluarlas en arena. Pero también sería necesario determinar la eficiencia, en cuanto a la recuperación de

formas preparasíticas en la arena, de métodos más simples de ejecutar, como el método de Willis con diferentes soluciones de flotación. De esta manera, se podría contar con un método simple, igualmente eficiente, que podría ser usado para el diagnóstico simultáneo de huevos y larvas en estudios de monitoreo de playas.

Hasta la fecha, no hay estudios sobre contaminación con agentes zoonóticos de origen parasitario en las playas de Montevideo. Es por dicha razón, que la presente propuesta tuvo como finalidad contribuir al estudio de estas importantes zoonosis causadas por endoparásitos de caninos mediante el estudio comparativo de técnicas de recuperación de huevos y de larvas de arena de playa, con el fin de estandarizar una técnica que fuera eficaz, repetible, sencilla y económica, para el aislamiento de las formas preparasíticas en arena.

2 HIPÓTESIS

La utilización del método de Willis permite recuperar huevos de la arena con una eficiencia igual o mayor que el método de sedimentación-flotación.

Soluciones de alta gravedad específica pueden ser utilizadas para la recuperación de larvas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Contribuir a los estudios epidemiológicos sobre larva migrans en playas de Montevideo, mediante la evaluación y puesta a punto de técnicas de recuperación de formas preparasíticas de helmintos en arena.

3.2 Objetivos Específicos

1. Determinar el porcentaje de recuperación de huevos de *Toxocara* spp. y larvas de *Ancylostoma* spp., en muestras de arena usando el método de Willis, con diferentes soluciones, con y sin el agregado de Tween® 20.
2. Determinar el porcentaje de recuperación de huevos de *Toxocara* spp. en muestras de arena usando un método de sedimentación-flotación con diferentes soluciones, con y sin el agregado de Tween® 20.
3. Determinar el porcentaje de recuperación de larvas de *Ancylostoma* spp. en muestras de arena usando el método de Baermann modificado.
4. Desarrollo de protocolos para detección de huevos y larvas en arena.
5. Indicar qué método diagnóstico es el más adecuado para estudios de recuperación de formas preparasíticas en arena, considerando eficiencia de recuperación y costos.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

Se plantearon como estrategia de investigación las siguientes etapas:

1. Determinar con qué soluciones de flotación se obtenían los mayores porcentajes de recuperación de elementos de origen parasitario, mediante el método de Willis.
2. Escoger las tres mejores soluciones, para posteriormente evaluarlas a través del método de centrifugación-flotación.
3. Utilizar el método de Baermann para recuperación de larvas.

Antes de iniciar el ensayo, los tres operadores realizaron un entrenamiento en el conteo y contaminación de la arena con huevos y larvas, con el fin de que cada uno de ellos pudiera realizar, en forma independiente, los distintos métodos. Posteriormente, se realizó un ensayo para determinar la variabilidad entre los operadores en relación a la contaminación de la arena y al conteo (ver sección Análisis estadístico). En base al resultado se decidió que la contaminación con huevos/larvas fuese realizada por sólo un operador para cada técnica.

4.1. Obtención de huevos de *Toxocara* spp. y L₃ de *Ancylostoma* spp.

Los huevos de *T. canis* fueron obtenidos por disección de hembras adultas, bajo lupa binocular (SZ51, Olympus, Tokio, Japón). Las mismas se obtuvieron de muestras de materia fecal y emesis de caninos infectados naturalmente, fueron almacenadas en solución Railliet y Henry hasta su uso. Las hembras fueron colocadas en vidrio reloj y mediante lupa binocular, pinza y bisturí, se realizó un corte longitudinal a lo largo de todo el ejemplar, luego se agregó suero fisiológico y, finalmente, se filtró hasta obtener una solución de suero fisiológico con huevos de *T. canis* en suspensión. La mayoría de los huevos obtenidos estaban larvados.

Las L₃ de *Ancylostoma* spp. se obtuvieron mediante coprocultivo de materia fecal de caninos infectados naturalmente. Primero se realizó la técnica de Willis para confirmar la presencia de huevos del parásito, posteriormente se realizó el coprocultivo (Dunn, 1983). Las L₃ se recuperaron a través de la técnica de Baermann (Laboratorio Central Veterinario, 1973). Debido a que no se obtuvo una cantidad suficiente de L₃ de *Ancylostoma* spp. para poner a punto las técnicas, se utilizaron L₃ de *Haemonchus* spp. por su similitud en tamaño (Nichols, 1956; Niec, 1968) y por estar siempre disponibles en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Veterinaria.

Los huevos y las larvas recuperadas fueron suspendidos en suero fisiológico (en forma independiente) y filtrados por un tamiz (con apertura de poro de 1 mm) a un tubo Falcon de 50 ml. El material fue identificado y almacenado a 4 °C hasta su uso (máximo 30 días).

4.2. Preparación de suspensiones de huevos y larvas

Tanto la suspensión de huevos como de larvas fueron diluídas con suero fisiológico hasta obtener una concentración final de 10, 50 y 100 huevos o larvas cada 100 µl. Las suspensiones tanto de huevos como de larvas fueron homogeneizadas con un vórtex. Posteriormente, se tomaron 100 µl y se contó la cantidad de elementos de origen parasitario. Este procedimiento se realizó 3 veces. En base al resultado de los

3 contajes, se ajustó la cantidad de huevos o larvas a un volumen final conocido. Las suspensiones se almacenaron en heladera a 4 °C hasta su utilización (máximo 7 días).

4.3. Muestras de arena

Para determinar qué tipo de arena era el más común y así poner a punto las técnicas con dicho sustrato, se recorrieron las playas de Montevideo más frecuentadas por el hombre. Se observó que la arena de grano medio era la más común. Por razones prácticas, se recogió la arena de Playa Verde.

Para aumentar la detectabilidad de las técnicas, en vez de usar 25 g de sustrato (Quinn y col., 1980; Dunsmore y col., 1984) o 30 g (Kazacos, 1983), se prefirió utilizar muestras de 50 g de arena siguiendo el protocolo de Oge y Oge (2000).

Se recogieron muestras de arena de grano medio de 10 kg cada una, en 10 oportunidades durante el período comprendido entre febrero y octubre de 2014. Las mismas fueron obtenidas a 3 m aproximadamente de la resaca dejada por el mar y a una profundidad de 20-30 cm comprendiendo un diámetro de 30 cm. Se colocaron en bolsas de nylon para su traslado al laboratorio. Luego se filtraron en un tamiz con 2 mm de tamaño de poro y se secaron en capas finas en horno a 150 °C durante 30 min. Para confirmar la ausencia de elementos preparásitos que pudieran interferir con el ensayo, se usó como control negativo en las técnicas, arena sin contaminar. Este procedimiento se realizó siempre que se secaba la arena recogida en las diferentes oportunidades. Finalmente, cada muestra se fraccionó en 50 g usando una balanza con 0,01 g de precisión (VI-200, Acculab®, Massachusetts, USA), se colocaron en tubos Falcon de 50 ml y fueron almacenadas a temperatura ambiente.

4.4. Preparación y contaminación de muestras de arena

Se establecieron tres grados de contaminación (GC), bajo, medio y alto: 10 (GC₁₀), 50 (GC₅₀) y 100 (GC₁₀₀) huevos o larvas cada 50 g de arena respectivamente. Quinn y col. (1980) encontraron contaminaciones menores a 6 huevos cada 25 g de muestras de suelo, por este motivo se utilizaron GC bajos. El límite de detectabilidad con el que se trabajó fue de 0,2; 1 y 2 elementos parasitarios/g. Se tomaron 100 µl de la suspensión de huevos/larvas a los que se les agregó 1,9 ml de agua. Se realizó la homogeneización en un vórtex para después contaminar la arena con esos 2 ml. Luego se agregó 1 ml de agua al tubo empleado para la mezcla inicial, con el propósito de enjuagar el mismo por si algún elemento parasitario hubiese quedado adherido. Para la contaminación homogénea de 50 g de arena se necesitan 3 ml de líquido (Oge y Oge, 2000). Una vez contaminada la arena, se realizó la homogeneización de la muestra manualmente. Como forma de verificar el número de huevos y larvas para cada GC, siempre que se realizó la contaminación de la muestra se tomó una alícuota de la suspensión de concentración conocida, y se contaron al MO los elementos parasitarios. Las muestras de arena contaminadas fueron identificadas y almacenadas a temperatura ambiente durante 48 h para luego ser procesadas.

4.5. Preparación de soluciones de flotación

Se preparó un stock de soluciones acuosas (agua corriente) de las siguientes sales:

1. 400 g de cloruro de sodio (NaCl) calidad técnica en 600 ml de agua (GE= 1,20).
2. 366 g de nitrato de sodio (NaNO₃) calidad farmacéutica en 1000 ml de agua (GE= 1,22).
3. 600 g de sulfato de zinc (ZnSO₄) calidad técnica en 1000 ml de agua (GE=1,20).
4. 920 g de sulfato de magnesio (MgSO₄) calidad técnica en 1000 ml de agua (GE=1,27).
5. 500 g de azúcar comercial en 1000 ml de solución saturada de cloruro de sodio (GE= 1,30).

Las soluciones fueron elaboradas a temperatura ambiente y sus GE medidos con densímetro (Fite S.A., Buenos Aires, Argentina), tanto en el momento de su realización como previo a su uso en las diferentes técnicas. El Tween® 20 fue usado al 0,025%.

4.6. Técnicas

Las muestras fueron analizadas mediante tres métodos: flotación según el método de Willis, sedimentación-flotación con diversas soluciones de flotación y, finalmente, el método de Baermann modificado. La lectura se realizó a las 48 h pos contaminación, por 3 operadores independientes realizando así 9 ensayos para cada GC. Para cada paso se fue utilizando la solución más eficiente del paso precedente. Durante la puesta a punto de las técnicas, se desarrollaron varios controles para determinar posibles pérdidas de huevos o larvas durante la ejecución de las técnicas.

4.6.1. Técnica de Willis

Para la recuperación de huevos de *Toxocara* spp. se utilizaron cinco soluciones de flotación: NaCl, NaNO₃, ZnSO₄, MgSO₄, azúcar+NaCl, con y sin el agregado de Tween® 20.

Para la recuperación de larvas se emplearon las soluciones de flotación que fueron más eficientes en la recuperación de huevos: NaNO₃+Tween® 20, MgSO₄ y azúcar+NaCl.

Se realizaron algunos ensayos previos, para descartar pérdidas de huevos durante la manipulación y determinar el tiempo de flotación para soluciones de alta y baja GE. A modo de ejemplo, para soluciones de baja GE, se contaron los huevos que subían en los primeros 5 min y luego a los 10 min. Para las soluciones de alta GE se usaron tiempos de 10 y 20 min. Por otro lado, se confirmó la ausencia de huevos en el tubo de Borrell, después de haber retirado los cubreobjetos. Como conclusión de los resultados obtenidos en estos experimentos previos se decidió usar como tiempo de flotación para todas las soluciones de baja GE 10 min (NaCl, NaNO₃, ZnSO₄ con y sin Tween® 20), y para alta GE 20 min (MgSO₄, azúcar+NaCl, con y sin Tween® 20).

Para las muestras contaminadas con huevos, se utilizaron 2 filtros, uno de 0,75 mm de apertura de poro y otro por encima, de 0,15 mm de apertura de poro. Para las muestras contaminadas con larvas sólo se utilizó un filtro de 1 mm de apertura de poro.

4.6.1.1 Controles durante la técnica de Willis

- Se usaron muestras contaminadas con 100 huevos de *Toxocara* spp.. A una muestra se le agregó la solución de flotación $ZnSO_4$ y se le dió un tiempo de flotación de 5 min. En otra muestra se utilizó azúcar+NaCl y un tiempo de flotación de 10 min. Luego de retirar los portaobjetos conteniendo las suspensiones, se succionó la superficie de los tubos de Borrell que fueron descargados en otro portaobjetos para verificar la ausencia de huevos en el microscopio óptico (MO) (BX40, Olympus, Tokio, Japón). Este procedimiento se repitió seis veces y en ninguna oportunidad se observaron huevos en la superficie del tubo de Borrell, confirmando que no se perdían huevos debido a la manipulación.

- Para descartar algún posible efecto de la presión osmótica sobre los huevos en soluciones de GE alta, se tomaron 100 μ l que contenían 50 huevos de *T. canis* y se suspendieron en 2 ml de solución de $MgSO_4$ +Tween® 20 y en 2 ml de la solución de azúcar+NaCl. Los mismos fueron observados y contados bajo MO a los 30 min, no observándose alteraciones morfológicas. Sin embargo, al hacer flotar los huevos en el tubo de Borrell, se registró una recuperación entre 20-30 %, sugiriendo que puede haber alteraciones estructurales no visibles o que la viscosidad de la solución podría interferir en el ascenso de los huevos.

4.6.2. Técnica de Sedimentación-flotación

Se analizaron muestras contaminadas con 10, 50 y 100 huevos de *T. canis*, y en base a los resultados obtenidos mediante la técnica de Willis, se evaluaron las soluciones más eficientes para la misma: $NaNO_3$, $MgSO_4$, azúcar+NaCl, con y sin Tween® 20.

Se utilizó la técnica descrita por Dunsmore y col. (1984), a la que se le realizaron algunas modificaciones para adecuarse a los utensilios, equipos y rutina del laboratorio (Tabla 1).

Tabla 1. Modificaciones aplicadas a la técnica descrita por Dunsmore y col. (1984)

Técnica Dunsmore y col. (1984)	Modificaciones
Muestra 25 g	Muestra 50 g
Remojo en agua+Tween® 80, toda la noche. Agitado 2 h	Remojo en agua+Tween® 20, 5 min. Agitado 2 h
Centrifugación 10 min Sedimentación	1° Sedimentación 30 min en copa 2° Sedimentación 10 min en tubo Falcon 50 ml
Descartar el sobrenadante y agregado NaNO ₃	Descartar del sobrenadante y agregado de NaNO ₃
Agitado	Agitado, reposo 10 min Se repite agregado de NaNO ₃
Centrifugación 10 min	Centrifugación 10 min

4.6.2.1 Descripción de la técnica (protocolo de Dunsmore y col. modificado):

1. Colocar la muestra contaminada en frascos plásticos de 500 ml. Agregar 100-150 ml de agua con Tween® 20 al 0,025 %. Enjuagar los tubos de las muestras con agua con Tween® 20 al 0,025 % para recuperar posibles huevos adheridos y verter el líquido de enjuague en el frasco donde se encuentra la muestra.
2. Agitar en shaker (KS 501, IKA®, Staufen, Alemania), durante 2 h a 180 rpm. Cada 10-15 min agitar vigorosamente en forma manual.
3. Homogeneizar y filtrar, por filtro de 0,75 mm y 0,15 mm de apertura de poro a una copa de sedimentación. Enrasar con agua a 1 L y dejar sedimentar por 30 min.
4. Descartar el sobrenadante dejando aproximadamente un sedimento de 1 a 2 cm.
5. Pasar el sedimento con pipeta Pasteur, a un tubo Falcon de 50 ml, Enjuagar bien la copa de sedimentación con agua y adicionar este líquido de enjuague al tubo Falcon hasta completar 45 ml. Cerrar el tubo Falcon, agitar manualmente y dejar sedimentar durante 10 min.
6. Descartar el sobrenadante y agregar 1 ml de la solución de flotación. Pasar el sedimento a un tubo Falcon de 15 ml, enjuagar el tubo Falcon de 50 ml repetidas veces con 1-2 ml de solución de flotación y pasar estos enjuagues al tubo Falcon

de 15 ml. Completar este tubo con solución de flotación hasta 12 ml, agitar bien y dejar flotar 10 min.

7. Pasar el sobrenadante a otro tubo Falcon de 15 ml.
8. Centrifugar a 1500-2000 rpm (H-11NA, Kokusan, Japón) por 10 min. Colocar los tubos en una gradilla y agregar más solución de flotación (2ml) hasta formar un menisco, colocar un portaobjetos en la superficie, esperar 10 min si se utiliza una solución de GE menor a 1,25 y 20 min para soluciones de GE mayores.
9. Retirar el portaobjetos y colocar un cubreobjetos para su lectura a 10X en MO.

4.6.2.2 Controles de la técnica

- Durante la optimización de la técnica se verificó que se mantuviera la GE de la solución original en el líquido obtenido en el paso 8, mediante densímetro.

- Para evaluar si una flotación es suficiente para la recuperación de huevos, después de retirado el cubreobjetos del tubo se le agregó un poco más de solución de flotación hasta formar nuevamente un menisco. Se colocó un nuevo cubreobjetos, se esperaron 10 min y se observó en MO. Este paso se realizó para las 10 primeras muestras. Se confirmó que no era necesaria una segunda flotación.

-Con el fin de verificar la ausencia de elementos parasitarios en el último sedimento, el mismo se retiró y se colocó en un portaobjetos para su observación en MO a 10X. Este control se realizó en las 10 primeras muestras. Una vez confirmado que el procedimiento era eficiente no se siguieron haciendo controles.

4.6.3. Técnica de Baermann modificada

Por medio de esta técnica se analizaron muestras con los siguientes GC de larvas infectantes: GC₁₀, GC₅₀ y GC₁₀₀. Se estudiaron tres tiempos de sedimentación: 3 h, 6 h y 24 h, en todos ellos se recuperaron larvas. Por razones prácticas se prefirió utilizar un tiempo de sedimentación de 24 h.

4.6.3.1 Descripción de la técnica (protocolo de la técnica)

1. En la parte superior de una copa de sedimentación de 1 L, colocar un filtro de 0,75 mm de apertura de poro y por encima de este, 4 gasas superponiéndose en forma cruzada.
2. Agregar la muestra de arena contaminada sobre el filtro y enjuagar varias veces el recipiente que contiene la arena con agua tibia para recuperar alguna posible larva que haya quedado. Verter este líquido de enjuague en la copa de sedimentación.
3. Agregar agua templada hasta contactar el fondo de la muestra.
4. Dejar sedimentar 24 h.
5. Retirar el filtro y eliminar el sobrenadante mediante el uso de una bomba de vacío. Con pipeta Pasteur tomar el sedimento y colocarlo en placas de Petri para su lectura en MO a 10 X.

4.7. Estimación de costos

Se valoraron todas las soluciones utilizadas, considerando el precio para la preparación de 1 L de cada solución, la dificultad de preparación de las mismas y el tiempo de ejecución de la técnica en el laboratorio. La dificultad de la preparación fue evaluada en base al tiempo de disolución de la sal, la necesidad de calor y la inestabilidad de la solución, que exige un ajuste previo a su uso.

Para la estimación de los costos de mano de obra se consideró el tiempo que se requiere para la realización de cada técnica. Para analizar una muestra mediante el método de Willis se requieren aproximadamente 20 min. En el caso de la técnica de sedimentación-flotación 4 h y para el método de Baermann modificado, 24 h de sedimentación más 1 h extra para el procesamiento de la muestra.

4.8. Análisis estadístico

Se elaboraron planillas utilizando el programa Microsoft Office Excel, donde se registraron los resultados obtenidos en los distintos métodos y soluciones evaluados. Los resultados fueron sometidos a un análisis de regresión, donde la variable respuesta fue la suma total de huevos o larvas recuperadas, y las variables explicativas fueron: el GC, el método de enriquecimiento, la solución de flotación, el operador y las muestras, usando el programa STATA 10. Se utilizó un nivel de confianza $\alpha = 0,05$.

4.8.1. Ensayo de repetibilidad de los operadores

Con el objetivo de evaluar la variabilidad de los operadores en la homogenización de las suspensiones y en el conteo de huevos y larvas se realizó el siguiente ensayo. Cada operador en forma independiente homogeneizó la suspensión de huevos o de larvas en un vórtex a velocidad máxima durante 30 s y tomó tres alícuotas de 100 μ l, que fueron colocadas en cajas de Petri y contabilizadas por todos los operadores. Este procedimiento se repitió 3 veces. En el caso de las soluciones que contenían larvas, las mismas se mataron con 5 μ l de solución Lugol (1%). Se realizó un análisis de regresión donde la variable respuesta fue el número de huevos o larvas y las variables explicativas fueron: el operador, la alícuota y el lector.

5 RESULTADOS

El análisis de regresión utilizado para determinar la variabilidad de los operadores en cuanto a la contaminación y el conteo de huevos o larvas mostró una variabilidad altamente significativa en la toma de la alícuota para contaminar la arena en uno de los operadores ($n=81$; $p < 0,001$). Sin embargo, no se observaron diferencias entre los operadores en la lectura de huevos o larvas. La repetibilidad del procedimiento fue buena, pero un operador presentó mucha variación en relación a sí mismo ($n=81$, $p=0,01$). Por dicha razón, para evitar errores en la contaminación debidas a la falta de atención durante ese delicado paso, se asignó un único operador para contaminar la arena para cada una de las técnicas.

El control de la contaminación de las formas preparasíticas para los diferentes GC confirmó que la destreza del operador era adecuada (repetible y confiable) y que las variaciones que se pudieran detectar estarían dadas por otros factores. Hubo una alta correlación entre el número esperado de elementos parasitarios a contaminar y el realmente contaminado. El coeficiente de correlación con el método de sedimentación-flotación fue 0,981, con el método de Willis para larvas 0,997 y con el método de Baermann 0,999. La forma de control que se aplicó fue correcta.

La recuperación de huevos estuvo influida por el método utilizado, el GC y en algunos casos por las soluciones ($n=843$; $R^2=0,49$; $p < 0,0001$). Se constató una relación directa entre el total de formas inmaduras recuperadas y el GC. Los métodos fueron repetibles, no encontrándose diferencias debidas al operador ni a las muestras.

En el método de Willis no se detectaron diferencias significativas en la recuperación de huevos usando las soluciones de NaNO_3 +Tween® 20, MgSO_4 y azúcar+NaCl. En la Tabla 2 se presentan los resultados de la recuperación de huevos de acuerdo al método de Willis, para cada solución de flotación y para cada uno de los GC. En GC bajo no se detectaron diferencias significativas para las soluciones de NaCl+Tween® 20, NaNO_3 , NaNO_3 +Tween® 20, ZnSO_4 +Tween® 20 y azúcar+NaCl. En general, todas estas soluciones mantuvieron un porcentaje de recuperación de huevos similar para los diferentes GC, pero con algunas soluciones la recuperación de los mismos disminuyó cuando el GC fue medio y alto (Figura 1). La solución de ZnSO_4 recuperó menos en GC alto, sin embargo, el porcentaje de recuperación fue uniforme para todos los GC cuando se le adicionó Tween® 20. Por el contrario, la solución de NaNO_3 +Tween® 20 aumentó su porcentaje de recuperación en más de 60% para contaminaciones medias y altas. Con esta solución se recuperaron significativamente ($p < 0,001$) más huevos en GC medio y alto.

Las soluciones con las que se obtuvieron porcentajes más altos de recuperación de huevos por el método de Willis fueron: NaNO_3 +Tween® 20, MgSO_4 y azúcar+NaCl. Por lo que fueron usadas en el método de sedimentación-flotación y también para la recuperación de larvas mediante el método de Willis, siguiendo la estrategia planteada inicialmente.

Tabla 2. Huevos recuperados de *Toxocara* spp. a partir de muestras de arena con distintos grados de contaminación, mediante la técnica de Willis con diferentes soluciones

Soluciones	GE ¹	N ²	GC ³ bajo (10 huevos/50 g)		GC ³ medio (50 huevos/50 g)		GC ³ alto (100 huevos/50 g)	
			Total	Media±DE ⁴	Total	Media±DE ⁴	Total	Media±DE ⁴
NaCl	1,20	27	0	0±0	22	2,44±1,81	48	5,33±1,58
NaCl+Tween	1,20	27	11	1,22±1,09	68	7,55±2,88	165	18,33±7,36
NaNO ₃	1,22	27	14	1,55±1,74	46	5,11±5,53	132	14,66±10,88
NaNO ₃ +Tween	1,22	27	12	1,33±1,32	133	14,78±3,46	209	23,2±8,33
ZnSO ₄	1,20	27	9	1±1,32	56	6,22±3,52	71	7,89±7,3
ZnSO ₄ +Tween	1,20	27	13	1,44±0,72	37	4,11±1,96	104	11,55±3,4
MgSO ₄	1,27	24	6	0,67±0,5	88*	14,66±6,77	131	14,55±4,72
MgSO ₄ +Tween	1,27	27	1	0,1±0,33	24	2,66±0,7	62	6,89±3,69
azúcar+NaCl	1,30	27	10	1,2±1,36	65	7,22±4,11	147	16,33±7,35
azúcar+NaCl+Tween	1,30	27	8	0,89±1,16	57	6,33±3,46	93	10,33±5,72

GE¹= gravedad específica; N²= 9 repeticiones por GC; GC³= grado de contaminación; DE⁴= desvío estándar; * fueron procesadas 6 muestras.

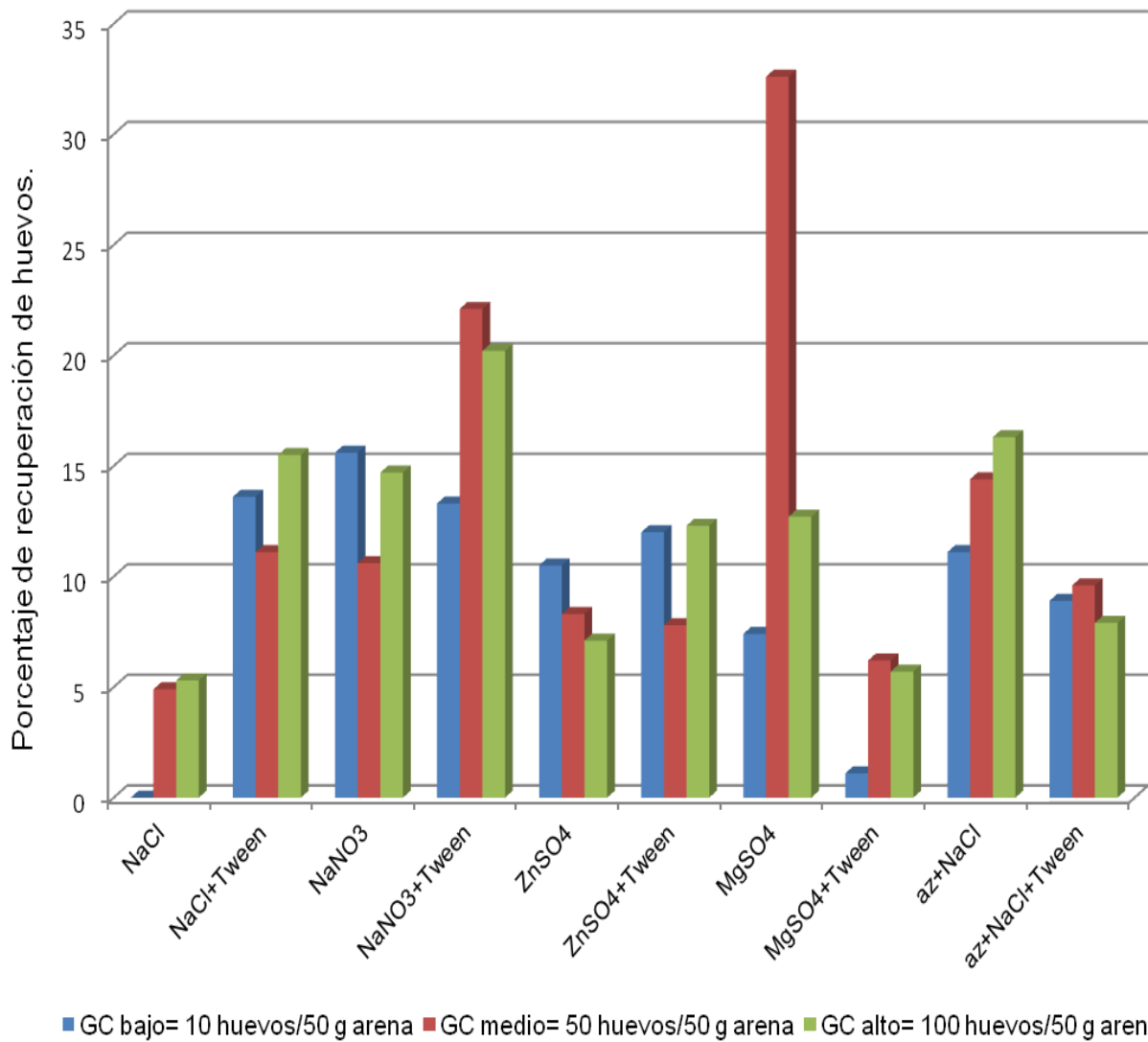


Figura 1. Porcentaje de recuperación de huevos mediante el método de Willis con diferentes soluciones de flotación de acuerdo al grado de contaminación (GC) en 50 g de arena.

En la Figura 2 y Tabla 3, se aprecian los resultados de la recuperación de huevos mediante la técnica de sedimentación-flotación. En líneas generales, la recuperación de huevos por el método de sedimentación-flotación, resultó ser significativamente menor que por el método de Willis, independientemente de la solución y el GC.

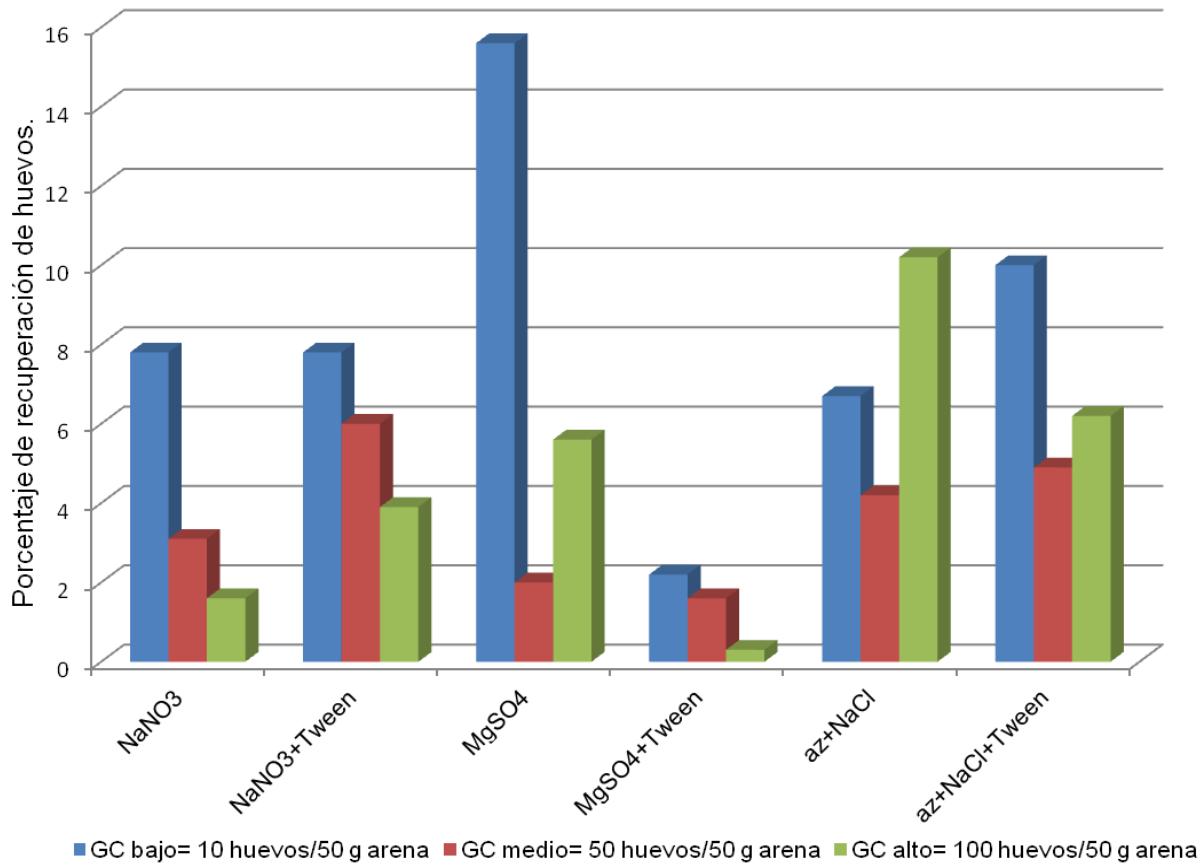


Figura 2. Porcentaje de recuperación de huevos mediante el método de sedimentación- flotación con diferentes soluciones de flotación de acuerdo al grado de contaminación (GC) en 50 g de arena.

La utilización del Tween® 20 tuvo efecto variable en la recuperación de elementos parasitarios. Se detectó una interferencia no significativa en la recuperación de huevos, debida a la adición de Tween® 20 a la solución de MgSO₄ y a la solución de azúcar+NaCl, donde con ambas soluciones hubo una disminución en la recuperación de huevos (Tabla 2 y Tabla 4). Por el contrario, el agregado de Tween® 20 a la solución de NaCl aumentó significativamente la recuperación en todos los GC, mientras que sólo tuvo un efecto favorable para la solución de NaNO₃ en GC medio y alto. Estos efectos debidos a la adición del detergente también se observaron para estas soluciones con el método de sedimentación-flotación (Tabla 5). Sin embargo, la adición de Tween® 20 a la solución con NaNO₃ en el método de sedimentación-flotación también tuvo un efecto positivo en la recuperación de huevos en el GC medio y alto (Tabla 5).

Tabla 3. Huevos recuperados de *Toxocara* spp. a partir de muestras de arena con distintos grados de contaminación, mediante la técnica de sedimentación-flotación con diferentes soluciones

Soluciones	GE ¹	N ²	GC ³ bajo (10 huevos/50 g)		GC ³ medio (50 huevos/50 g)		GC ³ alto (100 huevos/50 g)	
			Total	Media±DE ⁴	Total	Media±DE ⁴	Total	Media±DE ⁴
NaNO ₃	1,22	27	7	0,78±0,97	14	1,56±3,24	14	1,56±1,51
NaNO ₃ +Tween	1,22	27	7	0,78±1,09	27	3±3,57	35	3,89±1,96
MgSO ₄	1,27	27	14	1,56±1,77	9	1±1	51	5,67±4,33
MgSO ₄ +Tween	1,27	27	2	0,22±0,44	7	0,78±1,30	3	0,33±0,71
azúcar+NaCl	1,30	27	6	0,67±0,71	19	2,11±1,54	92	10,22±11,15
azúcar+NaCl+Tween	1,30	27	9	1±1,58	22	2,44±1,67	54	6,75± 4,80

GE¹= gravedad específica; N²= 9 repeticiones por GC; GC³= grado de contaminación; DE⁴= desvío estándar.

Tabla 4. Efecto de la adición de Tween® 20 a las soluciones de flotación en el método de Willis para la recuperación de huevos de *Toxocara* spp.

Solución de Flotación	Grados de contaminación		
	Bajo	Medio	Alto
NaCl	+	+	+
NaNO ₃	-/+	+	+
ZnSO ₄	-/+	-/+	+
MgSO ₄	-	-	-
azúcar+NaCl	-	-	-

Para valores de $p < 0,05$: (-/+): sin efecto; (+): aumento en la recuperación; (-): disminución en la recuperación; grados de contaminación: bajo=10 huevos en 50 g de arena, medio= 50 huevos en 50 g de arena, alto= 100 huevos en 50 g de arena

Tabla 5. Efecto de la adición de Tween® 20 a las soluciones de flotación en el método de sedimentación-flotación para la recuperación de huevos de *Toxocara* spp.

Solución de flotación	Grados de contaminación		
	Bajo	Medio	Alto
NaNO ₃	-/+	+	+
MgSO ₄	-	-/+	-
Azúcar+NaCl	+	-/+	-

Para valores de $p < 0,05$: (-/+): sin efecto; (+): aumento en la recuperación; (-): disminución en la recuperación; grados de contaminación: bajo=10 huevos en 50 g de arena, medio= 50 huevos en 50 g de arena, alto= 100 huevos en 50 g de arena.

Debido a la interferencia del detergente detectada previamente en la recuperación de huevos con estas soluciones, para la recuperación de larvas con el método de Willis se usaron las soluciones: NaNO_3 +Tween® 20, MgSO_4 y azúcar+NaCl sin la adición de Tween® 20. En la Figura 3 se presentan los porcentajes de recuperación de larvas mediante las distintas soluciones y para los diferentes GC. Se detectaron diferencias significativas con el uso de azúcar+NaCl y NaNO_3 +Tween® 20, obteniéndose un mayor porcentaje recuperación con esta última solución. La recuperación con MgSO_4 fue significativamente menor para los tres GC (Tabla 6).

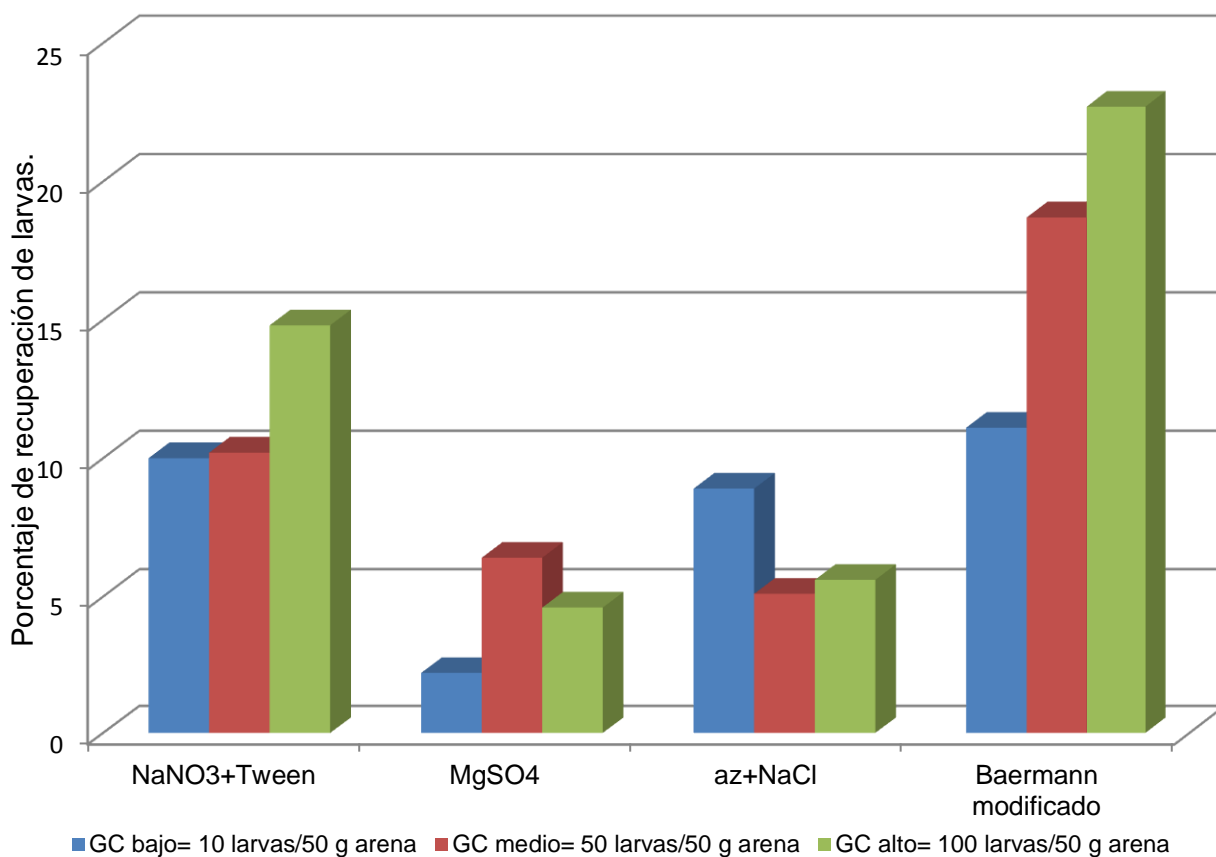


Figura 3. Porcentaje de recuperación de larvas mediante el método de Willis con diferentes soluciones de flotación y el método de Baermann modificado, de acuerdo al grado de contaminación (GC) en 50 g de arena.

En la Tabla 7 se exponen los resultados de la recuperación de larvas por el método de Baermann. Si bien la recuperación de larvas en GC bajo fue similar a la obtenida por el método de Willis con NaNO_3 +Tween® 20 o azúcar+NaCl (Tablas 6 y 7), cuando la contaminación fue alta el método de Baermann tuvo una recuperación 65 % mayor. El rango de recuperación de larvas por este método varió entre 11,1 % y 22,7 %. La recuperación de larvas fue significativamente mayor ($p < 0,0001$) que la obtenida por la técnica de Willis con NaNO_3 +Tween® 20 ($n=162$, $R^2=0,78$).

Tabla 6. Larvas de tercer estadio recuperadas de muestras de arena con distintos grados de contaminación, mediante la técnica de Willis con diferentes soluciones

Soluciones	GE ¹	N ²	GC ³ Bajo (10 larvas/50 g)		GC ³ Medio (50 larvas/50 g)		GC ³ Alto (100 larvas/50 g)	
			Total	Media±DE ⁴	Total	Media±DE ⁴	Total	Media±DE ⁴
NaNO ₃ +Tween	1,22	27	18	1±1,91	46	5,11±3,41	133	14,78±6,20
MgSO ₄	1,27	27	2	0,22±0,44	29	3,22±1,48	41	4,55±3,09
azúcar+NaCl	1,30	27	15	0,88±1,32	23	2,56±2,45	50	5,55±2,74

GE¹= gravedad específica; N²= 9 repeticiones por GC; GC³= grado de contaminación; DE⁴= desvío estándar.

Tabla 7. Recuperación de larvas de tercer estadio de muestras de arena con distintos grados de contaminación, mediante la técnica de Baermann modificada

Técnica	N ¹	GC ² bajo (10 larvas/50 g)			GC ² medio (50 larvas/50 g)			GC ² alto (100 larvas/50 g)		
		Total	Media±DE ³	%	Total	Media±DE ³	%	Total	Media±DE ³	%
Baermann modificado	27	10	1,11±0,78	11,1	84	9,33±4,24	18,7	204	22,67±4,64	22,7

N¹= 9 repeticiones por GC; GC²= grado de contaminación; DE³= desvío estándar; %= porcentaje de recuperación.

En las Tablas 8 y 9, se presenta el número de muestras analizadas que resultaron positivas, de acuerdo al método y a los GC. En los tres métodos se detectaron menos muestras positivas en GC bajos (0,2 huevos o larvas/g). Sin embargo, en GC altos (2 huevos o larvas/g) un gran número de muestras resultaron positivas.

Tabla 8. Frecuencia de muestras con presencia de huevos, de acuerdo al grado de contaminación (GC) y al método de recuperación utilizado.

Soluciones	Willis			Sedimentación-flotación		
	GC ₁₀	GC ₅₀	GC ₁₀₀	GC ₁₀	GC ₅₀	GC ₁₀₀
NaNO ₃	8/9	7/9	9/9	4/9	4/9	6/9
NaNO ₃ +Tween	11/18	9/9	9/9	4/9	6/9	9/9
MgSO ₄	6/9	6/6	9/9	5/8	5/9	9/9
MgSO ₄ +Tween	1/9	9/9	9/9	2/9	3/9	2/9
azúcar+NaCl	5/9	9/9	9/9	5/9	7/9	9/9
azúcar+NaCl+ Tween	4/9	9/9	6/6	3/9	8/9	9/9

GC 10= 10 huevos/50 g; GC 50= 50 huevos/50 g; GC 100= 100 huevos/50 g.

Tabla 9. Frecuencia de muestras con presencia de larvas, de acuerdo al grado de contaminación y al método de recuperación utilizado

Método de recuperación	Soluciones	Grados de contaminación		
		GC ₁₀	GC ₅₀	GC ₁₀₀
Willis	NaNO ₃ +Tween	5/9	9/9	9/9
	MgSO ₄	2/9	9/9	8/9
	azúcar+NaCl	4/9	6/9	9/9
Baermann	Nc	7/9	9/9	9/9

GC 10= 10 huevos/50 g; GC 50= 50 huevos/50 g; GC 100= 100 huevos/50 g.

Los costos y la dificultad de elaboración de las soluciones de flotación utilizadas en el presente trabajo se exponen en la Tabla 10. De las soluciones preparadas con sales de calidad técnica, la solución de NaCl fue la más barata y fácil de preparar y la solución de ZnSO₄ la más cara. Las soluciones de alta densidad fueron más complicadas de preparar. La solución de NaNO₃ se realizó con una sal de calidad farmacéutica por no haber en el mercado una sal de menor calidad, por lo que su precio es más alto que las de calidad técnica. La preparación de soluciones con esta sal no presentó ninguna dificultad. El costo de la solución más eficiente para la recuperación de huevos o larvas mediante la técnica de Willis (NaNO₃+Tween® 20) fue de \$U 1,26.

Tabla 10. Comparación de la preparación de soluciones de flotación, su costo por litro de solución (con y sin el agregado de Tween® 20) y por muestra, según el método de Willis y el método de Sedimentación-flotación

Sales	GE ¹	Grado de dificultad de elaboración	Precio/L (\$U)	Precio Tween 20® 0,025%/ L (\$U)	Willis ² (\$U)	Sedimentación-flotación ³ (\$U)
NaCl*	1,20	Bajo	5,2	2,43	0,42/0,29	0,13/0,09
NaNO ₃ **	1,22	Bajo	20,6	2,43	1,26/1,13	0,39/0,35
ZnSO ₄ *	1,20	Moderado	17,25	2,43	1,08/0,95	0,33/0,29
MgSO ₄ *	1,27	Alto	6,23	2,43	0,47/0,34	0,15/0,11
azúcar+ NaCl*	1,30	Alto	13,46	2,43	0,87/0,74	0,27/0,23

*= Calidad técnica; ** = calidad farmacéutica; GE¹= gravedad específica; Willis²= costo de solución de flotación con/sin Tween® 20 utilizada para analizar una muestra mediante la técnica de Willis; Sedimentación-flotación³= costo de solución de flotación con/sin Tween® 20 utilizada para analizar una muestra mediante la técnica de sedimentación-flotación.

6 DISCUSIÓN

La sensibilidad de las técnicas tiene gran importancia a la hora de estudiar lugares contaminados que constituyan un riesgo para la salud pública. No hay establecida una técnica para cada tipo de suelo, dada la gran diversidad de suelos existentes, los resultados de los estudios han sido muy variables, incluso utilizando una misma técnica.

En el presente estudio, para aumentar la detectabilidad de la técnica se realizaron contaminaciones con concentraciones bajas de huevos o larvas (0,2 huevos o larvas/g), menores a las utilizadas por Dada (1979), Quinn y col. (1980), y Dunsmore y col. (1984), quienes realizaron contaminaciones con 210 huevos/g, 16 huevos/g y 4 huevos/g, respectivamente. Estos autores, trabajaron con sustratos diferentes a la arena de playa. Oge y Oge (2000) al tratar de repetir las metodologías descritas por dichos autores pero aplicadas a la recuperación de huevos en arena, obtuvieron resultados muy diferentes. Al no existir otros trabajos que hayan evaluado los diferentes protocolos para la recuperación en arena, los resultados del presente trabajo serán discutidos en base a los estudios de Oge y Oge (2000).

En el presente trabajo se evaluó, por primera vez, el método de Willis usando arena como sustrato con la finalidad de contar con un método más simple y con menos equipamientos. La recuperación de huevos en arena de playa, en contaminación baja (0,2 huevos/g) y alta (2 huevos/g) fue más eficiente por este método que por la técnica de sedimentación-flotación, usada rutinariamente para la determinación de elementos preparásitos en los estudios de suelo. En términos generales, el método de Willis recuperó más huevos que la técnica de sedimentación-flotación usando las mismas soluciones, e incluso la recuperación fue mayor que la obtenida por otros autores. Oge y Oge (2000) obtuvieron porcentajes de recuperación menores a 6 % para la solución de $ZnSO_4$, no habiendo recuperado ningún huevo con el grado de contaminación más bajo, mientras que los obtenidos en este trabajo variaron entre 7,1 y 10 %, los cuales fueron porcentajes bajos en relación a otras soluciones evaluadas.

La solución saturada de NaCl es la más utilizada en la parasitología veterinaria, para hacer flotar huevos livianos de parásitos gastrointestinales que se encuentran en las heces. No resultó una buena solución para recuperar huevos en arena de playa, al compararla con las otras soluciones usadas. Sin embargo, el agregado de Tween® 20 aumentó su eficiencia a valores similares a los obtenidos con la solución de $NaNO_3$ y azúcar+NaCl, por lo que no se debería descartar como posible alternativa para estudios epidemiológicos. La solución de $ZnSO_4$ con y sin Tween® 20 fue más uniforme en la recuperación de huevos para los distintos GC, contrariamente a lo observado con $MgSO_4$, tal vez esto pueda deberse a la gran cantidad de burbujas que se produjo al usar dicha solución, lo que causaría la pérdida de elementos preparásitos ó la imposibilidad de su observación en MO. Cabe destacar que la solución de $MgSO_4$ de alta GE, requiere una intensa agitación para su preparación, y es poco estable, por lo que se debe chequear y en ocasiones ajustar su GE previo a ser utilizada. El mayor porcentaje de recuperación de huevos se obtuvo con la solución de $NaNO_3$ +Tween® 20, concordante con lo obtenido por Kazacos (1983) y Santarem y col. (2009). Esta solución, además de haber sido la más eficiente, resultó ser de fácil preparación en comparación con las soluciones de $MgSO_4$ y azúcar+NaCl, con las que se obtuvieron porcentajes de recuperación superiores a 10 %. Con azúcar+NaCl también se observó gran cantidad de burbujas. La

presencia de estas burbujas podría deberse a los niveles de salinidad y surfactantes naturales presentes en las muestras de arena (Bucher y Bucher, 2006). En el método de Willis no se tuvieron las mismas precauciones para disminuir la cantidad de burbujas cuando se usó $MgSO_4$ que en el método de sedimentación-flotación, por lo que es posible que esto explique las variaciones en los porcentajes de recuperación.

Los porcentajes de recuperación obtenidos mediante la técnica de sedimentación-flotación fueron más bajos que con el método de Willis utilizando las mismas soluciones. A su vez, el porcentaje de recuperación para la solución de $NaNO_3$ +Tween® 20 también fue menor al obtenido por Oge y Oge (2000). Estos autores, para las muestras contaminadas con 10, 100 y 500 huevos/50 g de arena lograron porcentajes de recuperación de 10 %, 15 % y 14,6 %, respectivamente. Si bien es posible que el prelavado de la muestra con Tween® 20 sea más eficiente, creemos que estas diferencias puedan deberse al agregado de un segundo paso de sedimentación en nuestro protocolo. El aumento de pasos en el protocolo aumentaría las probabilidades de que ocurra pérdida de huevos en alguno de ellos. Boray y Happich (1969) mencionan que el método de sedimentación que utilizan para la detección de huevos de *Fasciola hepatica*, sólo recupera un tercio de los huevos que están presentes en la muestra. A pesar de estas diferencias, el protocolo utilizado permitió recuperar huevos en los diferentes GC. El porcentaje de recuperación fue disminuyendo a medida que aumentaba el GC, lo que coincide con lo observado por Oge y Oge (2000) quienes obtuvieron porcentajes inferiores en las muestras contaminadas con 500 huevos/50 g de arena que los obtenidos con contaminaciones menores (10 y 100 huevos/50 g), independientemente de la solución utilizada. No encontramos explicación para estos resultados, ya que cabe esperar un porcentaje de recuperación similar o mayor cuando la contaminación es alta.

La adición de Tween® 20 tuvo resultados variables que llevan a pensar en posibles interacciones físicas con las diferentes soluciones. En algunas soluciones resultó positiva para la recuperación de huevos y negativa para otras. En el caso de la solución de NaCl, la adición de Tween® 20 aumentó más de 3 veces el porcentaje de recuperación tanto en GC bajos como altos. Su utilización en la solución de $NaNO_3$ también favoreció la recuperación, siendo la misma más homogénea para los diferentes GC, por lo que se sugiere su uso en esta solución. Sin embargo, la adición de este detergente a la solución de $MgSO_4$ tuvo un efecto negativo, tal vez porque favoreció la producción de burbujas que naturalmente se forman durante la preparación de esta solución, dificultando así la observación de las formas inmaduras de estos parásitos.

No existen trabajos previos que hayan estudiado la detectabilidad de larvas en muestras de suelo. Los resultados obtenidos muestran que el método de Willis, usando la solución de $NaNO_3$ +Tween® 20 puede ser usado para la recuperación de larvas en arena. Sin embargo, con la técnica de Baermann modificada la recuperación de larvas fue sustancialmente mayor para grados de contaminación medios y altos, por lo que se recomienda especialmente su uso.

Es importante resaltar que todos los métodos usados permitieron la recuperación de los elementos que se estudiaron. Las soluciones usadas en el método de Willis (que luego se emplearon en sedimentación-flotación), permitieron detectar elementos en casi la totalidad de las muestras analizadas, a diferencia de lo ocurrido con el

método de sedimentación-flotación, por lo que el método de Willis estaría también indicado para estudios de riesgo, donde lo importante es saber si la arena está o no contaminada, y no el GC. Al considerar las larvas, tanto el método de Willis con la solución de NaNO_3 +Tween® 20 como el método de Baermann detectaron como positivas casi la totalidad de las muestras cuando las contaminaciones fueron medias y altas. En contaminaciones bajas (0,2 larvas/g de arena), si bien ambos métodos no pudieron detectar larvas en la totalidad de las muestras, igual pueden ser de utilidad para estudios de riesgo epidemiológico ya que tuvieron más de la mitad de diagnósticos positivos.

La técnica de Willis es muy simple y rápida de realizar lo que implica un menor costo materiales y de mano de obra que las otras técnicas, haciendo de esta una técnica apropiada para estudios de prevalencia donde se requiere analizar grandes números de muestras. Si bien la solución de NaNO_3 +Tween® 20 fue la de mayor costo, esta es igualmente de bajo costo, considerando además que requiere menor tiempo para su elaboración. En la técnica de Baermann se maximizó el tiempo de laboratorio dejando sedimentar 24 h, lo cual resultó de gran ventaja, por lo que se recomienda ese tiempo para su realización.

7 CONCLUSIONES

El método de Willis fue más eficiente para la recuperación de huevos de *Toxocara* spp. en arena, independientemente de la solución de flotación utilizada.

La adición de Tween® 20 no siempre mejoró el porcentaje de recuperación de huevos de *Toxocara canis*.

Con el método de Willis, usando la solución de NaNO_3 +Tween® 20, se detectó un alto porcentaje de muestras con L3 de nematodos, siendo de utilidad para la diagnóstico de playas positivas a la presencia de estas larvas.

La utilización del método de sedimentación-flotación para la recuperación de huevos de *Toxocara* spp. en playas puede subestimar su riesgo epidemiológico sino se realiza un muestreo mayor que el que se podría usar con el método de Willis.

Con el método de Baermann se obtuvieron los mayores porcentaje de recuperación de larvas de *Ancylostoma* spp. en arena.

Los protocolos elaborados pueden ser ejecutados fácilmente por otros laboratorios para el monitoreo de la contaminación de huevos y larvas en arena de playa.

Tanto el método de Willis como el de sedimentación-flotación pueden ser utilizados para estudios de riesgo en playas, con algunas consideraciones, ya que con ambos se recuperaron huevos en muestras de arena.

El método de Willis con NaNO_3 +Tween® 20 (GE=1,22) es el método de elección para la recuperación de huevos de *Toxocara* spp. de muestras de arena de playa por su alta eficiencia, tanto en grados de contaminación bajos como altos.

El método de Willis es más práctico, sencillo y económico que el de sedimentación-flotación y que el método de Baermann modificado.

El método de Baermann es el indicado para la recuperación de larvas y sería de utilidad para estudios epidemiológicos en arena de playas.

8 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Acha, P.N., Szyfres B. (2003) Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: parasitosis. Washington, OPS, V.3.
2. Alonso, J.M., Luna, A.C., Fernández, G.J, Bojanich, M.V., Alonso, M.E. (2006) Huevos de *Toxocara* en suelos destinados a la recreación en una ciudad argentina. Acta Bioquím. Clín. Latinoam., 40(2): 219-222.
3. Alves Lima, A.M., Cámara Alves, L., Da Gloria Faustino, M.A., Silva De Lira, N.M., Magalhães, A., De Lima, M.M., Cabral Teixeira, W., Gomes Borges, J.C., De Souza Pimentel, D. (2007) Búsqueda de huevos de anquilostomídeos y toxocarídeos en el suelo de residencias y escuelas en el barrio de dois irmãos, Recife-PE (Brasil). Parasitol. Latinoam., 62: 89-93.
4. Ambroise-Thomas, P. (2000) Emerging parasite zoonoses: the role of host-parasite relationship. Int. J. Parasitol., 30: 1361-1367.
5. Bucher, E.H., Bucher, A. E. (2006). Limnología física y química. En: Bucher, E.H. Bañados del Río Dulce y Laguna Mar Chiquita. Córdoba, Argentina, Academia Nacional de Ciencias, p 79-101.
6. Cabrera, P.A., Sampaio, I., Parietti, S., Lavarello, L., Correa, O., Bossi, M., Rossi, D. (1987) Relevamiento de parásitos con significación zoonótica en *Canis familiaris*. IV Congreso Nacional de Veterinaria, Montevideo-Uruguay, p 56.
7. Carli, G.A. (2001) Isolamento de cultura de larvas de nematóides. En: Carli, G.A. Parasitología clínica. São Paulo, Atheneu, p 115-128.
8. Castro, O., Valledor, S., Crampet, A., Casás, G. (2013) Conocimiento de los metazoos parásitos del gato doméstico en el Departamento de Montevideo, Uruguay. Veterinaria (Montevideo), 49(19): 28-37.
9. Dada, B.J.O. (1979) A new technique for the recovery of *Toxocara* eggs from soil. J. Helminthol., 53: 141–144.
10. David, E.D., Lindquist, W.D. (1982) Determination of the Specific Gravity of Certain Helminth Eggs Using Sucrose Density Gradient Centrifugation. J. Parasitol., 68(5): 916-919.
11. Dent, J.H., Nichols, R.L., Beaver, P.C., Carrera, G.M., Stagers, R.J. (1956) Visceral larva migrans with case report. Am. J. Pathol., 32: 777–803.
12. Despommier, D. (2003) Toxocariasis: Clinical Aspects, Epidemiology, Medical Ecology, and Molecular Aspects. Clin. Microbiol. Rev., 16(2): 265–272.
13. Douglas, J.R., Baker N.F. (1966) Some host-parasite relationships of canine helminthes. Ann. Biol. Colloq. Ore. St. Coll., p 97-115.
14. Dunn, A.M (1983) Helminología veterinaria. 2ª. ed. Mexico, Ed El Manual Moderno, 390 p.

15. Dunsmore, J.D., Thompson, R.C.A., Bates, I.A. (1984) Prevalence and survival of *Toxocara canis* eggs in the urban environment of Perth, Australia. *Vet. Parasitol.*, 16: 303–311.
16. Ferreira, B.A., Ferreira, M.A. (1991) Larva Migrans Cutanea: Presentación de 89 casos registrados en el departamento de Tacuarembó. X Congreso Latinoamericano de Parasitología, Montevideo, Uruguay, p 91.
17. Gamboa, M.I. (2005) Effects of temperature and humidity on the development of eggs of *Toxocara canis* under Laboratory conditions. *J. Helminthol.*, 79: 327-331.
18. Gamboa, M.I., Kozubsky, L.E., Costas, M.E., Garraza, M., Cardozo, M.I., Susevich, M.L., Magistrello, P.N., Navone, G.T. (2009) Asociación entre geohelminths y condiciones socioambientales en diferentes poblaciones humanas de Argentina. *Rev. Panam. Salud Públ.*, 26(1): 1-8.
19. Gillespie, S.H., Dinning, W.J., Voller, A., Crowcroft, N.S. (1993) The spectrum of ocular toxocariasis. *Eye*, 7: 415–418.
20. Glickman, L.T., Magnaval, J.F., Domanski, L.M. Shofer, F.S., Salvatore, S.L., Gottstein B., Brochier, B. (1987) Visceral larva migrans in French adults: A new disease syndrome?. *Am. J. Epidemiol.*, 125(6): 1019–1034.
21. Glickman, L.T., Schantz, P.M. (1981) Epidemiología y patogénesis de la toxocariasis zoonótica. *Epidemiol. Rev.*, 3: 230-250.
22. Guimarães, A.M., Leonel Alves, E.G., Ferreira de Rezende, G., Costa Rodrigues, M. (2005) Ovos de *Toxocara* sp. e larvas de *Ancylostoma* sp. em praça pública de Lavras, MG. *Rev. Saúde Públ.*, 39(2): 293-295.
23. Happich, F.A. y Boray, J.C. (1969) Quantitative Diagnosis Of Chronic Fasciolosis. *Aust. Vet. J.*, 45: 326–328.
24. Hernández, S., Contera, M., Acuña, A., Elhordoy, D., Vignolo, J. (2003) *Toxocara* spp. en muestras de suelos y heces de plazas de la ciudad de Montevideo, Uruguay. *Rev. Patol. Trop.*, 32(1): 95-104.
25. Hotez, P.J., Narasimhan, S., Haggerty, J., Milstone, L., Bhopale, V., Schad, G. A., Richards, F.F. (1992) Hyaluronidase from Infective *Ancylostoma* Hookworm Larvae and Its Possible Function as a Virulence Factor in Tissue Invasion and in Cutaneous Larva Migrans. *Infect. Immun.*, 60(3): 1018-1023.
26. INE (2011) Disponible en: <http://www.ine.gub.uy/documents/10181/35289/analisispais.pdf> Fecha de consulta: 20 de julio 2016.
27. Institute of Medicine (2002) The Emergent of Zoonotic Diseases: Understanding the Impact Animal and Human Health. Washington, DC National Academy Press, 176 p.
28. Instituto Colombiano Agropecuario/Organización Panamericana de la Salud (2002) Salud Pública Veterinaria, protección sanitaria, y desarrollo agropecuario.

- Simposio Internacional sobre salud pública veterinaria. Memorias; Bogotá, Colombia, p 83-87.
29. Kazacos, K.R. (1983) Improved method for recovering ascarid and other helminth eggs from soil associated with epizootics and during survey studies. *Am. J. Vet. Res.*, 44: 896–900.
 30. Laboratorio Central Veterinario (1973) Manual de Técnicas de Parasitología Veterinaria. Zaragoza, Acribia, 196 p.
 31. Magnaval, J.F., Glickman, L.T., Dorchies, P., Morassin, B. (2001) Highlights of human toxocariasis. *Korean J. Parasitol.*, 39: 1-11.
 32. Malgor, R., Oku, Y., Gallardo, R., Yarzabal, L. (1996) High prevalence of *Ancylostoma spp.* infection in dogs, associated with endemic focus of human cutaneous larva migrans, in Tacuarembó, Uruguay. *Parasite*, 3: 131-134.
 33. Milano, A.M.F, Oscherov, E.B. (2002) Contaminación por parásitos caninos de importancia zoonótica de la ciudad de Corrientes, Argentina. *Parasitol. Latinoam.*, 57(3-4): 119-123.
 34. Miller, A.C., Walker, J., Jaworski, R., Launey, W., Paver, R. (1991) Hookworm Folliculitis. *Arch. Dermatol.*, 127; 547-549.
 35. Nichols, R.L. (1956) The Etiology of Visceral Larva Migrans: II. Comparative Larval Morphology of *Ascaris lumbricoides*, *Necator americanus*, *Strongyloides stercoralis* and *Ancylostoma caninum* *Am. J. Pathol.*, 42: 363-399.
 36. Niec, R. (1968) Cultivo e identificación de larvas infectantes de nematodos gastrointestinales del bovino y ovino. Manual técnico N°3. INTA, Buenos Aires, Argentina, 37 p.
 37. Nunes, C.M., Sinhorini, I.L., Ogassawara, S. (1994) Influence of soil texture in the recovery of *Toxocara canis* eggs by a flotation method. *Vet. Parasitol.*, 53: 269-274.
 38. Nunes, C.M., Pena, F.C., Negrelli, G.B., Anjo, C.G.S., Nakano, M.M., Stobbe, N.S. (2000) Ocorrência de larva migrans na areia de áreas de lazer das escolas municipais de ensino infantil, Araçatuba, SP, Brasil. *Rev. Saúde Públ.*, 34(6): 656-658.
 39. Oge, H., Oge, S. (2000) Quantitative comparison of various methods for detecting eggs of *Toxocara canis* in samples of sand. *Vet. Parasitol.*, 92: 75-79.
 40. Parsons, J.C (1987) Ascarid Infections of Cats and Dogs. En: Grieve, R.B. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.*, 17(6): 1307.
 41. Pérez G., Llanes B., Winkowsky K., Saldaña J., Holcman B. (1991) Contaminación de plazas y parques Públicos por helmintos en Montevideo. X Congreso Latinoamericano de Parasitología, Montevideo, Uruguay, p 297.

42. Plascencia-Gómez, A., Proy, H., Eljure, N., Atoche-Dieiguez, C., Calderón Rocher, C., Bonifaz, A. (2013) Larva migrans cutánea relacionada con *Ancylostomas*. *Dermatol. Rev. Mex.*, 57(6): 454-460.
43. Quinn, R., Smith, H.V., Bruce, R.G., Girdwood, R.W.A. (1980) Studies on the incidence of *Toxocara* and *Toxascaris* spp. ova in the environment. 1. A comparison of flotation procedures for recovering *Toxocara* spp. ova from soil. *J. Hyg.*, 84(1): 83–89.
44. Rosa Xavier, I.G., Ramos, B.C., Santarém, V.A. (2010) Recovery threshold of *Toxocara canis* eggs from soil. *Vet. Parasitol.*, 167: 77-80.
45. Salager, J.L. (2002) Módulo de enseñanza en fenómenos interfaciales. Universidad de Los Andes. Mérida. Disponible en: <http://www.firp.ula.ve/archivos/cuadernos/S300A.pdf> Fecha de consulta: 11 de junio de 2016.
46. Santarém, V.A., Giuffrida, R., Zanin, G.A. (2004) Larva migrans cutánea: ocorrência de casos humanos e identificação de larvas de *Ancylostoma* spp. em parque público do município de Taciba, São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 37(2): 179-181.
47. Santarém, V.A., Magoti, L.P., Sichieri, T.D. (2009) Influence of variables on centrifuge-flotation technique for recovery of *Toxocara canis* eggs from soil. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 51(3):163-167.
48. Santos, N.M., Góes da Silvia, V.M., Souza Thé, T., Barboza dos Santos, A., Peixoto de Souza, T. (2006) Contaminação das praias por parasitos caninos de importância zoonótica na orla da parte alta da cidade de Salvador-Ba. *R. Ci. Méd. Biol.*, 5(1): 40-47.
49. Scaini, C.J., Toledo, R.N., Lovatel, R.M., Dionello, M.A., Gatti, F.A.A., Susin, L.R.O., Signorini, V.R.M. (2003) Contaminação ambiental por ovos e larvas de helmintos em fezes de cães na área central do Balneário Cassino, Rio Grande do Sul. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 36(5): 617-619.
50. Soulsby, E.J.L. (1987) *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. 7ª. ed. México, Nueva Editorial Interamericana, 823 p.
51. Sousa González y Cáceres, A.P.S., De Assunção Gonçalves, F., Cazorla, I.M., Santos Carvalho, S.M. (2004) Contaminação do Solo por Helmintos de Importância Médica na Praia do Sul (Milionários), Ilhéus-Ba. *News Lab.*, 67: 146-155.
52. Taylor, M.R.H., Keane, C.T., O'Connor, P.O., Mulvihill, E, Holland, C. (1988) The expanded spectrum of toxocaral disease. *Lancet*, 1: 692–695.
53. Uruguay tiene más de un millón de perros (2009). *Zoonosis*, 1(1): 8-11.
54. Valledor, S., Castro, O., Décia, L., Eguren, J., Pérez, V., Haran, G., Cabrera, P. (2006) Relevamiento de helmintos intestinales en perros urbanos de Montevideo y Florida, y perros rurales del departamento de Florida, con el registro de un nuevo género de nemátodo parasitando al canino en nuestro país. *Veterinaria (Montevideo)*, 41(163-164): 43–49.

